

## 27. Recherches sur la biochimie des cyclitols IX

### Contribution à l'étude du métabolisme du *ms*-inositol chez le Rat II [1]

par E. Charollais et Th. Posternak

(22 XII 64)

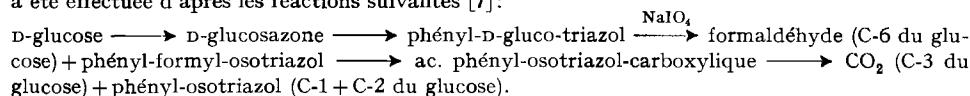
Le métabolisme du *ms*-inositol (I) chez le Rat a donné lieu à diverses études. Des recherches au moyen de cyclitol marqué par du  $^3\text{H}$  [2] et du  $^{14}\text{C}$  [3] avaient permis de préciser le mécanisme de la conversion de l'inositol en D-glucose. Par l'emploi de [ $^{14}\text{C}$ ]-inositol, on avait montré, d'autre part, qu'à côté de cette glucogenèse, il se produit chez le Rat normal une conversion importante en  $\text{CO}_2$  [4] [5]. Une petite partie du cyclitol est en outre incorporée dans les phospholipides. Le but du présent travail était d'étudier chez l'animal normal ou phloriziné les relations existant entre la formation de  $\text{CO}_2$  et la glucogenèse, et de préciser certains mécanismes.

**Méthodes expérimentales et résultats.** — *Substances radioactives:* *ms*-inositol-[U- $^{14}\text{C}$ ] (uniformément marqué) fourni par le RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham; *ms*-inositol-[2- $^{14}\text{C}$ ] synthétisé par les méthodes décrites précédemment [6].

*Administration des substances:* Les rendements radioactifs en  $\text{CO}_2$  étant notablement plus élevés chez le Rat à jeun, nous avons utilisé des animaux mâles de 135 à 370 g, soumis à un jeûne de 24 h. Le traitement des animaux par la phlorizine et l'administration d'inositol en 3 injections ont été effectués comme précédemment [2]; les temps en h indiqués dans les tableaux sont comptés à partir de la première injection.

Les animaux étaient placés dans des cages à métabolisme parcourues par un courant d'air décarbonaté. Le  $\text{CO}_2$  expiré recueilli dans KOH 1,5N était ensuite précipité comme  $\text{BaCO}_3$ . Le glucose urinaire a été isolé comme glucosazone.

*Dégradation du glucose:* Cette dégradation, en vue d'établir la répartition de la radioactivité, a été effectuée d'après les réactions suivantes [7]:



*Résultats:* Les tableaux suivants résument les observations effectuées.

Tableau I. Formation de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir d'inositol-[ $^{14}\text{C}$ ] chez le Rat non phloriziné, après un jeûne de 24 h

	N <sup>os</sup> des rats et % d'incorporation radioact. dans le $\text{CO}_2$ expiré				
Heures	Inositol-[2- $^{14}\text{C}$ ] (292000 c/min/mg)		Inositol-[U- $^{14}\text{C}$ ] (329000 c/min/mg)		
0-8	1: 24,3	2: 27,3	3: 22,2	4: 33,5	5: 23,9
8-16	6,5	6,0	4,4	3,1	6,3
16-24	2,0	1,5	2,2	3,0	3,2
Total 24 h	32,8	34,8	28,8	39,6	33,4

Poids des rats et radioact. adm. en c/min: 1: 355 g et  $2,92 \cdot 10^6$ ; 2: 370 g et  $3,79 \cdot 10^6$ ; 3: 275 g et  $3,29 \cdot 10^6$ ; 4: 290 g et  $3,29 \cdot 10^6$ ; 5: 290 g et  $3,29 \cdot 10^6$ .

Tableau II. Radioactivité et répartition isotopique dans le glucose urinaire après administration d'inositol-[2-<sup>14</sup>C] (16,4 et 24,5 mg) à des rats phlorizinés après un jeûne de 24 h

Heures	N° du rat	Glucose urinaire en mg	Répartition isotopique en % dans le glucose			
			C-1 + C-2	C-3	C-4 + C-5	C-6
0-8	6	288	32,6	1,4	10,8	55,2
8-16	6	360	—	—	—	—
16-24	6	288	—	—	—	—
0-24	7	1255	40,8	1,7	8,1	49,4

Poids des rats et radioact. adm. en c/min: 6: 350 g et  $7,15 \cdot 10^6$ ; 7: 300 g et  $7,83 \cdot 10^6$ .  
Radioactivité éliminée dans le glucose urinaire de 24 h: 6: 33,4%; 7: 37,2%.

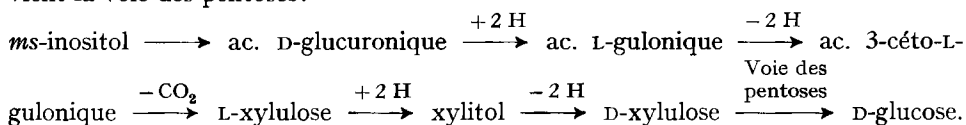
Tableau III. Radioactivité dans le CO<sub>2</sub> expiré et le glucose urinaire de rats phlorizinés après un jeûne de 24 h et traités par de l'inositol-[<sup>14</sup>C]

Heures	Inositol-[2- <sup>14</sup> C] <sup>1)</sup>			Inositol-[U- <sup>14</sup> C] <sup>1)</sup>		
	CO <sub>2</sub> expiré en % de rad. adm.	glucose urinaire mg	% rad. adm.	CO <sub>2</sub> expiré en % de rad. adm.	glucose urinaire mg	% rad. adm.
0-8	5,0 ± 0,7	202 ± 59	23,9 ± 1,5	14,7 ± 3,8	243 ± 65	16,7 ± 7,2
8-16	1,1 ± 0,4	108 ± 22	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,4	123 ± 14	0,7 ± 0,1
16-24	0,6 ± 0,2	97 ± 44	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2	66 ± 33	0,3 ± 0,1
Total 24 h	6,7 ± 0,8	407 ± 125	25,6 ± 1,4	17,3 ± 4,0	432 ± 68	17,7 ± 7,1

Inositol-[2-<sup>14</sup>C]: nombre de rats 2; poids 167 ± 22 g; inositol adm. 14,25 ± 0,75 mg; rad. adm.  $(6,80 \pm 0,36) \cdot 10^6$  c/min.

Inositol-[U-<sup>14</sup>C]: nombre de rats 4; poids 154 ± 16 g; inositol adm. 12,80 ± 3,68 mg; rad. adm.  $(3,83 \pm 1,04) \cdot 10^6$  c/min.

**Discussion.** – Des travaux antérieurs avaient permis d'élucider le mécanisme de la conversion de l'inositol en glucose [2] [3]. Le cyclitol est d'abord converti en acide D-glucuronique, qui subit ensuite une série de transformations dans lesquelles intervient la voie des pentoses:



Faisons remarquer qu'une de ces réactions, la décarboxylation de l'acide 3-céto-gulonique, implique un dégagement de CO<sub>2</sub>. Si l'on part de l'inositol-[2-<sup>14</sup>C], l'acide cétonique est marqué en C-2 et le CO<sub>2</sub> dégagé n'est pas radioactif. Nous désignons ce mode de formation de CO<sub>2</sub>, dépendant de la glucogenèse, par A; il est catalysé par la partie soluble des enzymes de l'homogénat de rein de Rat. Il existe un autre mode de production de CO<sub>2</sub>, que nous désignons par B; on l'observe en présence de la fraction particulière de l'homogénat de rein de Rat. RICHARDSON & AXELROD [8] avaient montré que ce 2<sup>e</sup> mode de formation est inhibé par l'arsénite.

<sup>1)</sup> Moyenne ± écart type (standard deviation).

Notons d'abord que chez le Rat normal à jeun, l'incorporation totale de la radioactivité de l'inositol dans le glucose et ses polysaccharides est relativement peu élevée. Si l'on tient compte des teneurs en glycogène [9] et des radioactivités spécifiques observées [3] [4], ainsi que du pool du glucose actif [10] (130 mg pour 100 g d'animal) on peut évaluer cette incorporation radioactive à moins de 5%. La formation de CO<sub>2</sub> est donc relativement peu importante par la voie A chez le Rat normal à jeun et s'effectue essentiellement par la voie B. Le tableau I montre que les incorporations de radioactivité<sup>1)</sup> dans le CO<sub>2</sub> sont sensiblement les mêmes après administration d'inositol-[2-<sup>14</sup>C] (moyenne de deux animaux: 33,8 ± 1,0%) et d'inositol-[U-<sup>14</sup>C] (moyenne de trois animaux: 33,9 ± 4,4%). Ceci ne peut s'expliquer que par une *combustion complète* de la substance. Le mécanisme exact de cette dégradation suivant la voie B est encore inconnu. Par des expériences de dilution isotopique, on avait toutefois montré [8] que ni le glucose, ni le *ms*-inosose-2, ni la gulonolactone ne sont des intermédiaires, alors que la D-glucuronolactone se forme probablement au cours de la dégradation.

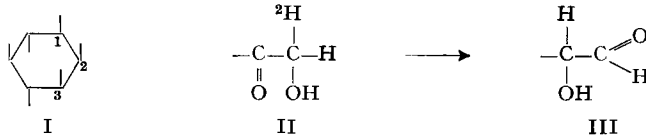
Le Rat phloriziné à jeun élimine en 24 h des quantités de glucose urinaire variant dans nos expériences, suivant le poids de l'animal, de 0,3 à 1,2 g. Ceci s'accompagne d'une exaltation remarquable (jusqu'à 700%) de la glucogenèse aux dépens de l'inositol. On constate en effet que l'incorporation du <sup>14</sup>C dans ce glucose urinaire, à partir de l'inositol-[2-<sup>14</sup>C], atteint en 24 h 33-37% chez des rats adultes (tableau II) et 24-27% chez des rats plus jeunes (tableau III).

D'après la représentation de la glucogenèse à partir de l'inositol exposée plus haut, un *ms*-inositol marqué en C-2 devrait fournir de l'acide D-glucuronique marqué en C-5, et finalement il en résulterait du glucose marqué en C-6. C'est ce que nous avons constaté par l'emploi d'inositol-[2-<sup>3</sup>H]. Employant l'inositol-[2-<sup>14</sup>C], ANDERSON & COOTS [3] avaient trouvé dans le glycogène du Rat normal un marquage à peu près égal en C-1 et C-6, ce qui résulte sans doute d'un transfert isotopique de la position C-6 à la position C-1 sous l'action de la phosphotriose-isomérase et de l'aldolase (randomization). Il devenait alors intéressant d'établir chez le Rat phloriziné la répartition isotopique dans le glucose urinaire formé à partir de l'inositol-[2-<sup>14</sup>C]. Nous avons constaté (tableau II) que le glucose excrété dans les 8 premières heures, qui n'a par conséquent pas séjourné longtemps dans l'organisme, est plus fortement marqué en 6 qu'en 1 + 2, le rapport des radioactivités C-6/(C-1 + C-2) étant en effet de 1,7. Dans le glucose urinaire total de 24 h, ce rapport tombe par contre à 1,2<sup>2)</sup>.

Il s'agit maintenant d'expliquer l'absence de quantité notable d'isotope en C-1 dans le glucose urinaire formé à partir du *ms*-inositol-[2-<sup>3</sup>H] [2]. On pourrait l'attribuer à un ralentissement des réactions de la phosphotriose-isomérase et de l'aldolase dû à un effet isotopique. D'autre part, LOEWUS [11] a établi la configuration en C-5 du D-xylose-[5-<sup>3</sup>H] formé dans les fraises à partir du *ms*-inositol-[2-<sup>3</sup>H]. Cette configuration doit se retrouver en C-1 dans l'acide fructose-6-phosphorique formé ultérieurement; la même configuration II est sans doute présente dans le produit deutérié formé chez l'animal. Elle est l'inverse de celle que nous avons indiquée [12] pour le dérivé du fructose formé à partir de la D-glucuronolactone-[1-<sup>2</sup>H]: il doit alors se

<sup>2)</sup> M. le prof. L. ANDERSON, Madison (communication personnelle) a obtenu des résultats analogues.

produire une perte de deutérium en C-1 du glucose (III) au cours de l'énolisation stéréo-spécifique produite par la réaction de la phosphoglucose-isomérase. Une autre cause de perte en deutérium est représentée par l'énolisation probable de l'acide 3-céto-[2-<sup>2</sup>H]-gulonique formé à partir de l'inositol-[2-<sup>2</sup>H]. Ces pertes additionnées expliquent ainsi que la quantité de deutérium dans le glucose urinaire (6% de l'isotope administré) [2] est beaucoup plus faible que celle du <sup>14</sup>C.



Comparons maintenant les radioactivités présentes dans le glucose urinaire et dans le CO<sub>2</sub> expiré, après administration resp. d'inositol-[U-<sup>14</sup>C] et -[2-<sup>14</sup>C]. On constate d'abord (tableau III) que la radioactivité totale<sup>1)</sup> éliminée en 24 h (CO<sub>2</sub> + glucose) est à peu près indépendante de la nature de l'inositol administré: resp. 35,0 ± 9,1% et 32,3 ± 2,2%. A partir de l'inositol-[U-<sup>14</sup>C], on trouve par contre une quantité de radioactivité<sup>1)</sup> plus forte dans le CO<sub>2</sub> expiré (17,4 ± 4,0%) et plus faible dans le glucose urinaire (17,7 ± 7,1%) qu'à partir de l'inositol-[2-<sup>14</sup>C] (CO<sub>2</sub> 6,7 ± 0,8%; glucose urinaire 25,6 ± 1,4%). Ces faits peuvent s'expliquer, tout au moins qualitativement, de la manière suivante. La dégradation par la voie B a considérablement diminué par suite de l'exaltation de la glucogénèse. En raison de cette dernière, il se forme alors par la voie A une quantité considérable de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> à partir de l'inositol-[U-<sup>14</sup>C]. Enfin, le glucose formé à partir de l'inositol, subit, avant l'élimination urinaire, non seulement une «randomization», mais aussi, en partie, une oxydation. Cette dernière s'effectue principalement par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF, suivie du cycle de KREBS, et aussi par le cycle des pentoses. Ce dernier cycle donne lieu à un dégagement de CO<sub>2</sub> provenant des premiers atomes de carbone de la chaîne; il se produira donc du CO<sub>2</sub> radioactif à partir du glucose-[U-<sup>14</sup>C] avec diminution de la radioactivité de ce dernier dans l'urine, mais ce ne sera pas le cas à partir du glucose-6-<sup>14</sup>C formé aux dépens de l'inositol-[2-<sup>14</sup>C]<sup>3)</sup>.

Pour toutes ces raisons, on doit s'attendre, après traitement par l'inositol-[U-<sup>14</sup>C], à une radioactivité plus forte dans le CO<sub>2</sub> expiré, et plus faible dans le glucose urinaire, qu'après administration d'inositol-[2-<sup>14</sup>C]. On voit donc que les résultats obtenus sont qualitativement en accord avec notre représentation de la glucogénèse.

Nous exprimons notre gratitude au FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE pour l'aide qu'il nous a apportée. Nos remerciements vont aussi à Mme I. ZIMMERMANN pour sa collaboration technique.

#### RÉSUMÉ

Des rats normaux et phlorizinés ont été traités par du *ms*-inositol-[U-<sup>14</sup>C] et -[2-<sup>14</sup>C]; chez le Rat normal, les radioactivités dans le CO<sub>2</sub> expiré sont sensiblement les mêmes, ce qui implique une combustion complète de l'inositol. Chez le Rat phloriziné, il se produit une exaltation remarquable de la glucogénèse à partir de

<sup>3)</sup> Mentionnons à titre d'exemple qu'en présence de coupes de foie, le rendement radioactif en CO<sub>2</sub> est environ 3 fois plus élevé à partir du glucose-[U-<sup>14</sup>C] que du glucose-[6-<sup>14</sup>C] [13].

l'inositol. La radioactivité dans le  $\text{CO}_2$  expiré est alors notablement plus faible après administration d'inositol-[2- $^{14}\text{C}$ ] qu'après celle d'inositol-[U- $^{14}\text{C}$ ]; le rendement radioactif dans le glucose urinaire est par contre plus faible à partir de l'inositol-[U- $^{14}\text{C}$ ]. Ces faits, ainsi que les répartitions isotopiques observées dans le glucose urinaire, ont été discutés et expliqués.

Laboratoires de Chimie biologique et organique spéciale  
de l'Université, Genève

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Communication préliminaire: C. r. Séances Soc. Phys. Hist. Nat. Genève, séance du 15 oct. 1964 (*Arch. Sci.* 1964, sous presse).
  - [2] TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & D. REYMOND, *Helv.* 38, 1283, 1660 (1955); TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER, D. REYMOND & C. LARK, *Helv.* 41, 235 (1958).
  - [3] L. ANDERSON & R. H. COOTS, *Biochim. biophysic. Acta* 28, 666 (1958).
  - [4] H. HERKEN, D. MAIBAUER & F. WEYGAND, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 233, 301 (1958).
  - [5] E. A. MOSCATELLI & J. LARNER, *Arch. Biochemistry Biophysics* 80, 26 (1959); D. A. NIXON, *Nature* 187, 77 (1960).
  - [6] TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & R. HUGUENIN, *Helv.* 40, 1875 (1957).
  - [7] R. M. HANN & C. S. HUDSON, *J. Amer. chem. Soc.* 66, 735 (1944); H. v. PECHMANN, *Liebig's Ann. Chem.* 262, 290 (1891); C. T. BISHOP, *Science* 117, 715 (1953).
  - [8] K. E. RICHARDSON & B. AXELROD, *Biophys. biochim. Acta* 32, 265 (1959).
  - [9] *Biochemisches Taschenbuch*, p. 828, Springer-Verlag, Berlin 1956.
  - [10] D. D. FELLER, E. H. STRISOWER & I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 187, 571 (1950).
  - [11] F. A. LOEWUS, *Arch. Biochemistry Biophysics* 105, 590 (1964).
  - [12] TH. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER & E. CHAROLLAIS, *Helv.* 43, 1980 (1960).
  - [13] J. KATZ, S. ABRAHAM, R. HILL & I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 214, 853 (1956).
-